云 南 植 物 研 究 2006, **28** (2): 123~126
Acta Botanica Yunnanica

普洱熟茶后发酵加工过程中曲霉菌的分离和鉴定

陈可可, 朱宏涛, 王 东, 张颖君*, 杨崇仁*
(中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源可持续利用国家重点实验室, 云南 昆明 650204)

摘要: 从云南省易武、基诺山、普洱和昆明后发酵加工生产的普洱熟茶堆中分离到7种曲霉菌, 分别鉴定为: 温特曲霉烟色变种, 帚状曲霉, 具黄曲霉, 埃及曲霉, 臭曲霉, 日本曲霉原变种, 以及局限灰曲霉。发现不同产地普洱熟茶中曲霉菌菌群的组成存在差异, 对曲霉菌在普洱熟茶生产中的作用与意义进行了初步的讨论。

关键词: 普洱熟茶; 大叶茶; 后发酵; 曲霉菌
中图分类号: Q 949 文献标识码: A 文章编号: 0253-2700(2006)02-123-04

Isolation and Identification of *Aspergillus* Species from the Post Fermentative Process of Pu-Er Ripe Tea

CHEN Ke-Ke, ZHU Hong-Tao, WANG Dong, ZHANG Ying-Jun*, YANG Chong-Ren*
(*State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204, China)

Abstract: The *Aspergillus* flora during the post fermentative process of Pu-Er ripe tea was studied. Seven *Aspergillus* species, including *A. wentii* var. *fumeus*, *A. penicilliodes*, *A. aureolatus*, *A. egyptiacus*, *A. foetidus*, *A. japonicus* var. *japonicus*, and *A. restrictus*, were isolated and identified from the fermentative stacks of Pu-Er ripe tea produced from several different places of Yunnan Province of China. It is noticed that the compositions of fungus flora in the post fermentative process of different Pu-Er ripe tea produced from different places were different. The significance of *Aspergillus* species on the production of Pu-Er ripe tea was primarily discussed.

Key words: Pu-Er ripe Tea; *Camellia sinensis* var. *assamica*; Post fermentation; *Aspergillus*

普洱熟茶(Pu-Er ripe tea)是以云南特产的大叶茶(*C. sinensis* var. *assamica*)等大叶种茶的晒青毛茶(普洱青茶, Pu-Er green tea)为原料, 经后发酵过程再加工的茶类。按传统的生产工艺, 普洱熟茶的人工后发酵通常采用渥堆的方式, 在微生物的参与下进行。上世纪80年代陈宗道等(1988)曾报道普洱熟茶渥堆过程中存在黑曲霉(*Aspergillus niger*)、灰绿曲霉(*A. glaucus*)、青霉(*Penicillium* sp.)、根霉(*Rhizopus* sp.)和酵母(*Saccharomyces* sp.)等微生物, 并认为黑曲霉约占微生物总数的80%左右。最近, 周红杰等(2004)从昆明德顺茶厂以临沧镇康毛茶为原料渥堆发酵生产的普洱熟茶堆中分离到黑曲霉、灰绿曲霉、土曲霉(*A. terreus*)、白曲霉(*A. candidus*)、常现青霉(*P. frequentans*)、产黄青霉(*P. chrysogenum*)、以及未鉴定菌种的根霉和酵母等, 亦认为黑曲霉在普洱茶渥堆过程中始终以优势菌群存在。普洱熟茶的品质与产地, 原料来源, 加工工艺等有关, 微生物在普洱熟茶的制作中起着重要的作用。因此, 进一步研究普洱熟茶加工过程中的微生物菌群, 对于普洱熟茶生产工艺的技术提升, 制定普洱熟茶科学的质量标

* 通讯联系人 Corresponding author. E-mail: zhangyj@mail.kib.ac.cn, cryang@mail.kib.ac.cn
收稿日期: 2005-08-03, 2005-08-29 接受发表
作者简介: 陈可可(1959-)男, 助理研究员, 主要从事植物生物学与菌物学研究。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

准等均有重要的意义。本文报道我们对不同产地普洱熟茶生产过程中主要微生物菌种的分离和鉴定，同时，对这些微生物在普洱熟茶生产中的作用与意义进行了初步的讨论。

1　材料和方法

1.1　试验材料

试验样品：勐腊县易武镇庆春号第一次翻堆的普洱熟茶样品；景洪市基诺山千年古茶树厂的普洱熟茶堆；普洱县特种茶厂最后一次翻堆的普洱熟茶样品，昆明实验室研制的普洱熟茶样品。

1.2　菌种的分离与鉴定

培养基：选用改良 PDA 培养基进行菌种分离，培养基组成为：优质马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，琼脂 18 g，磷酸二氢钾 1 g，硫酸镁 0.5 g，蛋白胨 4 g，加水至 1 000 ml，灭菌前调 pH 至 5.5。

菌种分离：精密称取 1 g 普洱熟茶样品，置于培养皿，用无菌蒸馏水冲洗 3 次，将样品转移至无菌研钵中研碎，加入 9 ml 无菌水稀释，之后用同样的等浓度梯度进行稀释，使之配成 10^{-1}，10^{-2}，10^{-3}，10^{-4}，10^{-5} 等 5 个浓度梯度，用无菌移液管吸取 1 ml 缓缓注入平板培养基内，摇匀，密封置于 28℃条件下暗培养，4~ 5 d 后菌落长满整个平板。

菌种纯化：根据初分菌落的形态特征，用接种针挑取各菌落的少量菌丝体，接种在事先准备好的 PDA 琼脂培养基上（每平板内接种 3 个菌落），菌丝体生长 1 周后，根据长出的各菌落特点进行筛选和纯化，如此反复，直至菌落的生长状态和形态特征均表现一致时视为单一菌种的菌落。

2　结果

从云南省易武、基诺山、普洱和昆明后发酵加工生产的普洱熟茶堆中，分离纯化得到 7 个单一菌种，它们均为半知菌亚门（Deuteromycotina），丝孢纲（Hyphomycetes），丝孢目（Hyphomycetales），丛梗孢科（Moniliaceae），曲霉属（*Aspergillus*）的真菌。菌种的形态学（图 1）分别描述如下：

温特曲霉烟色变种（*Aspergillus wentii* Wegner var. *fumeus* Qi & Sun）：菌落培养 5 天时，直径 19 ~ 25 mm，中心开始产生孢子，菌落成同心圆环状向外形成 3 圈，中心为灰绿色的孢子圈，中部为疏松的乳白色菌丝圈，外层是紧贴培养基的乳白色菌丝圈。菌落中部有放射状皱缩，菌落反面

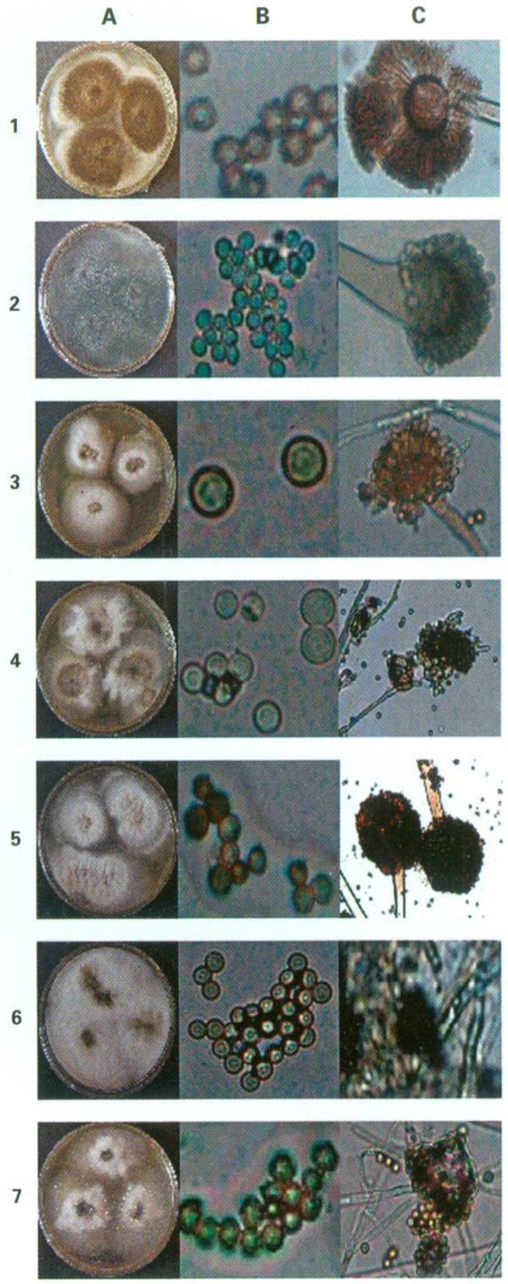

图 1　普洱茶后发酵加工过程中的曲霉菌

A. 菌落；B. 分生孢子；C. 产孢结构

1. 温特曲霉烟色变种；2. 帚状曲霉；3. 具黄曲霉；4. 埃及曲霉；5. 臭曲霉；6. 日本曲霉原变种；7. 局限灰曲霉

Fig. 1　*Aspergillus* species of Pu-Er tea during post fermentation process

A. Colony; B. Conidia; C. Conidial head

1. *A. wentii* var. *fumeus*; 2. *A. penicillioides*; 3. *A. aureolatus*; 4. *A. egyptiacus*; 5. *A. foetidus*; 6. *A. japonicus* var. *japonicus*; 7. *A. restrictus*

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

浅黄褐色。10 天后，菌落直径 32~ 38 mm，表面布满孢子，黄褐色。菌落反面浅黄色。产孢结构双层；分生孢子头球形至辐射形，直径 100~ 500 μm；分生孢子梗生自基部菌丝层；顶囊球形或近球形，直径 20~ 70 μm；分生孢子球形或近球形，直径 5~ 7 μm，壁粗糙。

帚状曲霉（*Aspergillus penicilliodes* Speg.）：菌落培养 5 天时，直径 28~ 31 mm，中心开始产生孢子，菌落成同心圆环状向外形成两圈，中心圈为深蓝色的孢子圈，有不规则的放射状皱缩，外圈为疏松的白色菌丝圈，菌落反面黄白色。10 天后，菌落长满培养皿，表面布满孢子，墨绿色，菌落反面乳黄色。产孢结构单层；分生孢子头辐射形至圆柱形，长 100~ 200 μm；分生孢子梗生自基质；顶囊烧瓶形，直径 10~ 20 μm；分生孢子球形或近球形，直径 3~ 5 μm，壁粗糙。

具黄曲霉（*Aspergillus aureolatus* Munt.–Cvet. & Bata）：菌落培养 5 天时，直径 30~ 38 mm，中心开始产生少量浅褐色孢子，向外为硬壳状乳白色菌丝圈，有规则的放射状沟纹，最外层为疏松的乳白色菌丝圈，菌落反面乳黄色。10 天后，菌落直径基本不变，中心的产孢圈逐渐扩大，孢子颜色由浅褐色变为灰色，硬壳状菌丝圈也逐渐扩大，出现规则的放射状突起，菌落反面橘黄色。产孢结构双层；分生孢子头辐射形至短柱形，长 50~ 150 μm；分生孢子梗生自基质或气生菌丝；顶囊球形或半球形，直径 8~ 16 μm；分生孢子球形或近球形，直径 4~ 5 μm，壁极粗糙，具小刺。

埃及曲霉（*Aspergillus egyptiacus* Moub. & Moust）：菌落培养 5 天时，直径 32~ 35 mm，未产生孢子，中心为浅灰色硬壳状菌丝圈，有放射状皱缩，边缘为疏松的灰色菌丝圈，培养基呈浅黄色。10 天后，菌落直径 40~ 47 mm，产生大量气生菌丝，很难看到分生孢子结构，中部变褐色，外部变乳白色。产孢结构双层；分生孢子头球形至疏松放射形，直径 30~ 80 μm；分生孢子梗生自气生菌丝，孢梗茎短；顶囊半球形，直径 6~ 12 μm；分生孢子球形或近球形，直径 3~ 4 μm，壁光滑。

臭曲霉（*Aspergillus foetidus* Thom & Raper）：菌落培养 5 天时，直径 25~ 28 mm，中心为浅黄色孢子圈，向外为硬壳状乳黄色菌丝圈，边缘为白色菌丝圈，培养基呈黄色。10 天后，菌落直径 35~ 38 mm，中心浅黄色孢子圈稍有扩大，但不明显，向外的硬壳状菌丝圈由乳黄色变为白色，边缘仍为白色菌丝圈，菌落反面橘黄色，并有规则的放射状皱纹。产孢结构双层；分生孢子头球形至放射形，直径 50~ 200 μm；分生孢子梗生自基质；顶囊球形或近球形，直径 20~ 40 μm；分生孢子球形或近球形，直径 4~ 6 μm，壁稍粗糙。

日本曲霉原变种（*Aspergillus japonicus* Saito var. *japonicus*）：菌落培养 5 天时，直径 28~ 30 mm，中心为褐色孢子圈，向外为黄白色菌丝圈，菌落反面浅黄色。10 天后，菌落长满培养皿，呈絮状白色菌丝，中心为灰色的孢子圈。产孢结构单层；分生孢子头球形至放射形，直径 40~ 70 μm；分生孢子梗生自基质；顶囊球形或近球形，直径 10~ 50 μm；分生孢子球形或近球形，直径 4~ 5 μm，壁有刺。

局限灰曲霉（*Aspergillus restrictus* Smith）：菌落培养 5 d 时，直径 16~ 17 mm，乳白色，未产生孢子，菌落反面黄色。10 d 后，菌落直径 32~ 38 mm，中心黑色，向外为硬壳状白色菌丝圈，外围是絮状乳白色菌丝圈。产孢结构单层；分生孢子头柱状；分生孢子梗生自基质或气生菌丝；顶囊半球形，直径 5~ 15 μm；分生孢子椭圆形，4~ 6 μm × 3~ 4 μm，壁粗糙。

3　讨论

通过随机采样，从勐腊县易武镇的普洱熟茶堆中分离到温特曲霉烟色变种，帚状曲霉，具黄曲霉和日本曲霉变种；从景洪市基诺山的普洱熟茶堆中分离到帚状曲霉，具黄曲霉，臭曲霉，日本曲霉变种和局限灰曲霉；从普洱县普洱熟茶堆中分离到温特曲霉烟色变种，臭曲霉和局限灰曲霉；从昆明试验普洱熟茶堆中分离到埃及曲霉。

结果表明，不同地区普洱熟茶堆中的曲霉菌群组成有明显的差别。易武和基诺山的普洱熟茶菌群种类较丰富，帚状曲霉、具黄曲霉和日本曲霉变种均仅从二者中分离到，二者的曲霉菌群组成最为相似，可能与两地相似的高温高湿热带气候环境有关。陈宗道等（1988）和周红杰等

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

(2004) 均认为黑曲霉为普洱熟茶加工过程的主要菌群, 我们未分离到黑曲霉, 可能与我们试验样品的产地以及原料来源和加工工艺等与之不同有关。亦不排除上述文献对曲霉菌的菌种鉴定有误所至。

曲霉菌为一类重要的真菌, 广泛存在于自然界, 多生于腐烂水果、食物、皮革和衣履表面。曲霉的菌丝体发达, 有大量分枝, 呈白色、黄色、灰色和黑色等多种颜色; 壁厚的细胞上生出分生孢子梗, 分生孢子生于孢子梗的膨大部分; 孢子有黄、绿蓝、棕、黑等色。曲霉菌是生物酶的重要来源, 可产生纤维素酶、蛋白酶、酯酶等, 并富含单宁酶 (黑曲霉, 臭曲霉, 日本曲霉等), 具有降解水解单宁生成没食子酸, 并能产生深红色。一些曲霉菌在食品工业和发酵工程中有重要意义 (如酱油曲霉等)。黄曲霉等则为致病致癌的微生物。

臭曲霉和日本曲霉为易武、基诺山和普洱等地普洱熟茶堆的主要菌种, 二者均有降解水解单宁, 促进没食子酸形成和产生深红色的作用 (Van Diepeningen 等, 2004; Mukherjee and Banerjee, 2004)。在普洱熟茶原产地的传统加工工艺中形成的普洱熟茶特殊的品质和风味, 很可能与臭曲霉和日本曲霉的作用有重要的关系。

我们曾对普洱熟茶及其原料中的多酚类成分进行较系统的化学研究, 分离鉴定了一系列的化合物 (张雯洁等, 1995; 周志宏和杨崇仁, 2000; 周志宏等, 2005), 发现二者的化学成分有显著的差异。而且, 普洱熟茶多酚类成分的组成随原料和加工工艺的不同也有明显的差别。一些地区普洱熟茶中没食子酸的含量显著增加 (折改梅等, 2005), 成为主要的抗氧化活性成分。这可能与曲霉菌对茶多酚中没食子儿茶素类成分的降解有关。

鉴于曲霉菌为普洱熟茶的后发酵生产过程中的主要菌群, 又是发酵工业中的重要工业微生物, 有些菌种是环境中的致病菌, 有必要对普洱熟茶的曲霉进行深入的研究, 阐明曲霉菌菌群在普洱熟茶后发酵过程中的作用, 及其对普洱熟茶化学物质生成和风味形成的意义。同时, 应进一步研究曲霉菌的生物学特性及其代谢产物对普洱熟茶品质的影响。

致谢 云南农业大学植保学院刘云龙先生协助鉴定菌种。

〔参 考 文 献〕

齐祖同, 1997. 中国真菌志 [M]. 北京: 科学出版社, **5**: 18—118

陈宗道, 刘勤晋, 周才琼, 1988. 微生物与普洱茶发酵 [J]. 中国茶叶, (4): 4—7

Mukherjee G, Banerjee R, 2004. Biosynthesis of tannase and gallic acid from tannin rich substrates by *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus foetidus* [J]. *J Basic Microbiol*, **44** (1): 42—8

She GM (折改梅), Zhang XL (张香兰), Chen KK (陈可可), *et al*, 2005. Content variation of theanine and gallic acid in Pu-Er tea [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **27** (5): 572—576

Van Diepeningen AD, Debets AJ, Varga J, *et al*, 2004. Efficient degradation of tannic acid by black *Aspergillus* species [J]. *Mycol Res Aug*, **108** (8): 919—25

Zhang WJ (张雯洁), Liu YQ (刘玉清), Yang CR (杨崇仁), 1995. Chemical constituents of "ecological tea" from Yunnan [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **17** (2): 204—208

Zhou HJ (周红杰), Li JH (李家华), Zhao LF (赵龙飞), *et al*, 2004. Study on main microbes on quality formation of Yunnan Pu-Er tea during pile-fermentation process [J]. *J Tea Sci* (茶叶科学), **24** (3): 212—218

Zhou ZH (周志宏), Yang CR (杨崇仁), 2000. Chemical constituent of crude green tea, the material of Pu-Er tea in Yunnan [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), **22** (3): 343—350

Zhou ZH (周志宏), Zhang YJ (张颖君), Xu M (许敏), *et al*, 2005. Puerins A and B, two new 8-C substituted flavan-3-ols from Pu-Er tea [J]. *J Agric Food Chem*, **53**: 8614—8617

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net